



Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

# **Surfaktant protein D - fysiologin och dess roll som biomarkör för perifera lungproblem hos djur**

*Jonas Kallunki Nyström*

---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: 36

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2014

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## **Surfaktant protein D - fysiologin och dess roll som biomarkör för perifer lungsjukdom på djur**

Surfactant protein D - the physiology and it's roll as a biomarker for peripheral lung disease in animals

*Jonas Kallunki Nyström*

**Handledare:**

Clarence Kvart, SLU, Institutionen för Anatomi, fysiologi och biokemi

**Examinator:**

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2014

**Omslagsbild:** -

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: 36  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

**On-line publicering:** <http://epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Surfaktant protein D, biomarkör, perifera lungproblem, djur, fysiologi

**Key words:** Surfactant protein D, biomarker, peripheral lungproblems, animals, physiology



## INNEHÅLLSFÖRETECKNING

<b>Sammanfattning</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>2</b>
<b>Inledning</b> .....	<b>3</b>
<b>Material och metoder</b> .....	<b>4</b>
<b>Litteraturöversikt</b> .....	<b>5</b>
Luftvägarnas uppbyggnad.....	5
Förvarsmekanismer i luftvägarna.....	5
Surfaktant.....	5
Struktur och biologiska egenskaper .....	5
Förekomst.....	6
Reglering.....	6
Lunghomeostas och antiinflammatoriska funktioner .....	7
Roll i immunförsvaret.....	8
Förändringar vid lungskada.....	8
Funktion som biomarkör .....	9
<b>Diskussion</b> .....	<b>13</b>
<b>Referenser:</b> .....	<b>17</b>

- BAL - Bronkoalveolärt Lavage
- COPD - Chronic Obstructive Pulmonary Disease
- CRD - Carbohydrate Recognition Domain
- IAD - Inflammatory Airway Disease
- IL - Interleukin
- IPCD - Interstitial Pneumonia with Collagen Disease
- IPS - Idiopathic Pulmonary Fibrosis
- LPS - Lipopolysackarid
- PAP - Pulmonary Alveolar Proteinosis
- SP-D - Surfaktant protein D

## **SAMMANFATTNING**

Användningen av biomarkörer inom medicin är ett viktigt verktyg för att ställa diagnos och fatta terapeutiska beslut. Surfactant protein D (SP-D) har visat sig vara en lovande biomarkör för perifera lungsjukdomar på humansidan och har därför även börjat studeras inom veterinärmedicinen.

Surfactant protein D är ett relativt lungspecifikt protein och produceras främst i perifera delar av lungorna, f.f.a av claraceller i bronkioler och typ II pneumocyter i alveoler. Det fungerar som ett akutfasprotein med liknande egenskaper som kollektiner och är därför viktigt för medfödda immunförsvaret. Förutom detta har det också visat sig vara grundläggande för normala lunghomeostasen genom att utgöra en beståndsdel i surfactant. Mekanismerna bakom dess funktion i lungan är dock inte helt klarlagda.

Eftersom SP-D är så basalt för lungan påverkas det ofta kraftigt vid perifera lungskador. Denna påverkan kan i sin tur leda till förändringar i både BAL-vätska och serum och på så sätt kan SP-D fungera som en potentiell biomarkör. Studier har bl.a visat att SP-D kan användas som biomarkör för inflammatory airway disease (IAD) på häst. Exakt hur SP-D påverkas vid lungskador är inte helt fastsällt.

Egenskaperna hos SP-D verkar vara liknande för de flesta djurslag och individer inom samma djurslag, men många studier har visat att vissa typer av skillnader ändå föreligger, så som struktur, extrapulmonär produktion och reglering. Dessa skillnader kan göra att den patofysiologiska processen också varierar, vilket kan försvåra tillämpningen av SP-D som biomarkör för perifer lungsjukdom inom veterinärmedicinen.

Majoriteten av de studier som gjorts är humana och de finns ett flertal perifera lungsjukdomar för vilka SP-D visats vara användbar som biomarkör. Veterinära studier är inte alls lika många utförda och kunskapen om SP-D är således mycket lägre på veterinärsidan. För att med säkerhet inom veterinärmedicinen kunna basera diagnoser och terapeutiska beslut med SP-D som biomarkör måste fler studier göras på djur eftersom extrapolering från humanmedicin till veterinärmedicin inte är pålitlig.

## **SUMMARY**

The use of biomarkers in medicine is an important tool for diagnosis and therapeutical decisions. Surfactant protein D (SP-D) has been shown to be a promising biomarker for peripheral lung disease in human medicine, which has stimulated research concerning its potential use in veterinary medicine as well.

Surfactant protein D is a relatively specific lung protein and mostly produced in the peripheral parts of the lung by clara cells in the bronchioles and type II pneumocytes in the alveoli. It functions as an acute phase protein with similar properties as collectins and is therefore important for the innate immune system. It has also been shown to be essential for normal lung homeostasis being an important part of surfactant. The exact mechanisms behind its function in the lung are however not completely understood.

Since SP-D is so essential to the lung it is often markedly affected by peripheral lung damage. This impact can in turn lead to changes in both BAL-fluid and serum and in this way SP-D could function as a potential biomarker. Studies have shown that SP-D can be used as a biomarker for inflammatory airway disease (IAD) in horses. Exactly how SP-D is affected during different forms of lung damage is not completely understood and needs further studies.

Properties of SP-D seem to be the same for most animal species and individuals within the same species, although many studies have shown that some types of differences do exist, such as structure, extrapulmonary production and regulation. These differences can affect pathophysiologic processes, which in turn can make the use of SP-D as a biomarker for peripheral lung disease in veterinary medicine more difficult.

The majority of all performed studies are done in human medicine with the conclusion that SP-D has shown to be useful as a biomarker in some peripheral lung diseases. Veterinary studies are only a few and the knowledge about SP-D is not as investigated as in human medicine. If veterinarians are going to be able to base their diagnoses and therapeutical decisions on SP-D as a biomarker, more animal studies are needed since extrapolation from human medicine to veterinary medicine sometimes is incompatible.

## INLEDNING

Biomarkörer är objektiva diagnostiska fynd och tecken som används inom medicin för att ställa diagnos och fatta terapeutiska beslut. De kan utgöra allt från pulsmätning till komplicerade labtester. Till skillnad från diagnostiska symtom är de inte beroende av vare sig veterinärens subjektiva bedömning eller patientens subjektiva upplevelse och behöver därför inte korrelera med patientens egen känsla av hur denne mår. Således går det att upptäcka sjukdomar när de fortfarande är subkliniska, vilket också innebär att behandling kan sättas in tidigt innan sjukdomen och skadorna den orsakar blivit allvarligare. Inom veterinärmedicinen utgör biomarkörer extra viktiga verktyg eftersom en veterinär inte kan kommunicera direkt med sin patient. (Tzouvelekis et al., 2005).

En biomarkör kan antingen vara prognostisk eller diagnostisk. Diagnostiska biomarkörer används för att ställa diagnos och uppvisar onormala värden så fort sjukdom föreligger. Prognostiska biomarkörer används för prognoser och kan däremot ha normala värden när sjukdom föreligger men ändras när en sjukdom förvärras eller förbättras. Hur bra en biomarkör är bestäms av dess specificitet och sensitivitet. Sensitivitet definieras som andelen patienter med en viss sjukdom som får ett positivt svar medan specificitet definieras som andelen patienter utan den sjukdomen som får negativt eller normalt svar. Fåtalet biomarkörer är dock varken unika för en viss sjukdom eller har specifika tröskelvärden för positiva och negativa svar och fungerar därför ofta bara som komplement vid diagnostik och prognoser. (Tzouvelekis et al., 2005).

Forskningen kring biomarkörer har kommit längre inom humanmedicinen än veterinärmedicinen på i stort sett alla fronter, inte minst perifera lungsjukdomar. Några av de biomarkörer som har studerats för perifer lungsjukdom är cytokiner, enzymer, adhesionsmolekyler och produkter från typ 2 pneumocyter, d.v.s surfaktant. Surfaktant protein D (SP-D) har visat sig vara en av de mest lovande biomarkörerna inom humanmedicinen och har därför även börjat studeras på veterinärsidan (Tzouvelekis et al., 2005). Dess lungspecifitet har gjort att den bl.a kunnat användas för att skilja patienter med sepsis och samtidig acute respiratory distress syndrome (ARDS) från patienter med bara sepsis (Ware et al., 2013).

Provtagning görs oftast genom bronkoalveolärt lavage (BAL), d.v.s ett lungsköljsprov där provtagning av bronkoalveolär vätska görs för att studera innehållet av t.ex celler eller proteiner. Det går även att provta serum eftersom sekretionerna ofta också ses i blodet, dock i mindre mängd, men SP-D kan fortfarande uppvisa signifikanta variationer i koncentration för olika lungsjukdomar.

Syftet med denna litteraturstudie är att undersöka den normala fysiologiska rollen för SP-D och huruvida SP-D fungerar som biomarkör för perifera lungsjukdomar på djur, grundat på den forskning och litteratur som finns idag.



## **MATERIAL OCH METOD**

Detta arbete är en litteraturstudie där informationen främst baseras på vetenskapliga artiklar men även böcker har använts

Litteraturen som utgör grunden för detta arbete har i första hand tagits via sökmotorer såsom PRIMO, Sciencedirect, Google scholar och PubMed. Sökord som användes var surfactant protein D OR SP-D, lung disease OR airway disease OR respiratory disease, biomarker OR marker OR biological marker OR diagnosis, horse OR equine OR animals OR veterinary medicine

## LITTERATURÖVERSIKT

### Luftvägarnas uppbyggnad

Luftvägarna kan delas upp i en luftledande, en övergående och en gasutbytande del. Till den luftledande delen hör näs- och munhåla, nasopharynx, pharynx, larynx, trachea samt extra- och intrapulmonära bronker där trachea och bronker omges av broskringar. Den övergående delen går över i perifera lungan och utgörs av bronkioler som är fortsättningar på de intrapulmonära bronkerna men saknar broskringar. Gasutbytande delen innefattar alveoler linjerade av typ 1 och typ 2 pneumocyter (López, 2012).

### Försvarmekanismer i luftvägarna

Främmande partiklar avlägsnas, destrueras, neutraliseras genom clearance, d.v.s nysning, hosta, mukociliär transport och fagocytos. Luftledande delen linjeras av flerradigt cilierat cylindriskt epitel blandat med bägarceller. Bägarcellerna producerar lipider, glykoproteiner och antimikrobiella substanser medan epitelceller och underliggande körtlar producerar en serös vätska. Tillsammans bildar produkterna ett skyddande slem som fångar upp främmande partiklar. Epitelcellernas cilier transporterar kontinuerligt slemmet mot svalget där det sväljs och elimineras via gastrointestinalkanalen. Bronkioler saknar bägarceller och epitelcellerna förlorar gradvis sin ciliering mot gasutbyteszonen, vilket innebär oförmåga till mukociliär transport. Istället är bronkiolerna utrustade med Claraceller som producerar surfaktant och innehåller cytokrom p450-enzym viktiga för xenobiotisk metabolism. I alveolerna utgörs försvaret främst av alveolära lungmakrofager som fagocyterar främmande material men även typ 2 pneumocyterna bidrar genom att liksom claraceller producera surfaktant (Grubor et al, 2004; López, 2012).

### Surfaktant

Surfaktant är en komplex sammansättning av stukturellt heterogena fosfolipider tillsammans med surfaktantspecifika proteiner (I Tzouvelekis et al., 2005). Det består till 90% av fosfolipider som är viktiga för att minska ytspänningen vid gränsytan där luften möter vätskan i lungan så att diffusion av syre och koldioxid kan ske. Resterande 10% av surfaktanten utgörs av de 4 olika surfaktantproteinerna SP-A, SP-B, SP-C och SP-D (Bianca et al., 2001). SP-B och SP-C är av lågmolekylär vikt och hydrofoba medan SP-A och SP-D är av hög molekylär vikt och hydrofila (Tzouvelekis et al., 2005). Tillsammans med fosfolipiderna reglerar surfaktant protein B och C ytspänningen medan surfaktant protein D och A f.f.a är betydelsefulla för medfödda immunförsvaret (Sorensen et al., 2007).

### Struktur och biologiska egenskaper

Surfaktant protein D (SP-D) är ett lösligt hydrofilt kalciumberoende kolhydratbindande protein, även kallat C-typ-lektin, och tillhör familjen kollektiner (kollageninnehållande C-typ lektin). En enstaka molekul av SP-D är ca 43kDA tung och uppbyggd av tre proteinsubenheter, d.v.s utgör en homotrimer. Varje homotrimer har fyra domäner med olika funktion; ett korslänkande N-terminaldomän; ett kollagenbaserat trippelhelixdomän i varierande längd viktigt för stabilitet och oligomerisering; ett  $\alpha$ -helikalt L-domän i nackregionen som binder till CRD; ett kalciumberoende C-type lectin carbohydrate

recognition-domän (CRD) som m.h.a  $\text{Ca}^{2+}$  binder till olika grupper av ligander, bl.a kolhydrater, lipider och nukleotider (Sorensen et al., 2007). Affiniteten varierar med liganden där kolhydrater, f.f.a maltos, binds bäst (Crouch, 1998). Homotrimererna sammanfogas ofta till multimerer i olika grad innan utsöndring, vilket innebär att SP-D kan anta olika strukturella former. Vanligast är att fyra homotrimerer subenheter sammanfogas för att tillsammans bilda en dodekamer ( $4 \times 3 = 12$ ). I vissa fall kan ännu större multimerer bildas genom att dodekamerer automatiskt sönderfaller och därefter självsammankopplas med varandra till multimerer uppbyggda av 32 homotrimerer eller fler. Dessa former är mer potenta vad gäller mikrobiell agglutinerings och interaktion med leukocyter, dock ej med lipopolysackardier (LPS). Funktionen hos SP-D är således avhängig den strukturella uppbyggnaden (Crouch, 1998; Sorensen et al., 2007). Multimeriseringen och proteinets uppbyggnad varierar mellan olika arter och individer. Nötkreatur och människa kan utsöndra rena trimerer (Crouch, 1998). Grisens SP-D skiljer sig från människans och nötkreaturens genom att vara större och det enda kända SP-D som är glykosylerat vid CRD-regionen men skiljer sig däremot inte vad gäller bindningsspecificiteten (Soerensen et al., 2004). Hästens SP-D uppvisar viss likhet med människans genom att ha en vikt på 43 kDa och ett CRD-domän som är nästintill identiskt, dock uppvisar övriga delar av proteinet inga likheter vad gäller aminosyrasekvensen (Kankavi och Roberts, 2003). Eftersom CRD-domänen är den del av SP-D-molekylen antikropparna i många analysmetoder binder till är likheterna mellan humant SP-D och ekvint SP-D en förutsättning för att humana analysmetoder ska kunna användas på häst (Richard et al., 2011).

### **Förekomst**

Generellt är SP-D ett ytbeläget protein och associeras till slemhinnor. Det produceras och utsöndras f.f.a i lungorna av typ II pneumocyter i alveoler, claraceller i bronkioler, serösa celler i tracheobronkalkörtlar i submukosa och bägarceller. Produktionsintensiteten varierar dock mellan arter, individer och individuella celler (Bianca et al., 2001). Surfaktantproteiner uttrycks även extrapulmonärt där mängd och plats varierar mellan olika arter (Soerensen et al., 2005; Bianca et al., 2001). På nöt uttrycks SP-D förutom i lungorna också bl.a i mukosan i urinvägarna och magtarmkanalen och på gris i tår- och tarmkörtlar (Meyerholz och Ackermann, 2005; Soerensen et al., 2005). På häst finns SP-D i synovialvätska i leder där det är viktig för fosfolipidhomeostasen och smörjningen i leden (Kankavi och Roberts, 2003). Studier på möss har också visat att det är detekterbart i låga koncentrationer i blod utan att någon form av lungskada föreligger, vilket kan bero på en direktutsöndring av SP-D från lungorna till blodet (Kingma et al., 2010). Förekomst i blodet kan också bero på produktion av endotelceller (Sorensen et al., 2007).

### **Reglering**

Surfaktanthomeostasen i lungan regleras genom en kombination av syntes, sekretion, clearance, återvinning och nedbrytning (Herbein and Wright., 2001). Surfaktant antas återvinnas i en hastighet av ca 10% av totala mängden varje timme (McIntosh et al., 1996). Exakt hur SP-D regleras är dock inte fastställt. SP-D-genen finns i ett locus tillsammans med flera andra kollektiner. Det förekommer viss variation mellan individer i enskilda nukleotider i DNA't, d.v.s single nucleotide polymorphisms (SNPs) - 95 SNPs

finns på människa. Exakta transkriptionsregleringen av SP-D är dåligt undersökt men regleras i stort av transkriptionsfaktorer, hormoner och epigenetiska faktorer. På människa innehåller promotorsekvensen för SP-D glucocorticoid responsive elements och kan därför påverkas av glukokortikoider. Detta sker troligtvis genom att glukokortikoiderna har en permissiv effekt för transkriptionen av SP-D och således indirekt höjer nivåerna (Sorensen et al., 2007; Honda et al., 1995). Uppströms om SP-D-genen finns också flertalet cis-regulatoriska element som bl.a innehåller sekvenser liknande akutfasproteiner (Crouch, 1998).

Nivåerna av SP-D förändras med åldern. Prenatalt ökar surfaktantpoolen med kroppsvikt och ytarea på alveoler, vilket gäller för alla däggdjursarter. Normala, friska nyfödda ungar har således absolut högst nivåer. Efter födseln minskar dock surfaktantpoolen med ökad ålder tills de når vuxna nivåer (Ikegami et al., 2006).

Olika celltyper varierar vad gäller hur, var och när SP-D lagras och utsöndras. Claraceller lagrar sitt SP-D i vesikler under längre tid medan typ 2 pneumocyterna utsöndrar SP-D direkt till lumen. Detta innebär att Claraceller, vid rätt stimulus, kan utsöndra större mängder under längre tid, d.v.s tills deras SP-D-pool tar slut, jämfört med typ 2 pneumocyter (Grubor et al., 2004).

Nedbrytningen av SP-D i en normal frisk lunga utförs främst av makrofager och typ 2 pneumocyter medan försumbar nedbrytning utförs av lymfocyter och neutrofiler. Lungans cellsammansättning är således viktig för nedbrytningen (Herbein och Wright, 2001). Cellsammansättningen varierar med olika tillstånd i lungan men också mellan olika djurslag. Cellerna i BAL-vätska hos en normal frisk hund utgörs till ca 80% av makrofager medan de hos häst istället utgörs av 50% makrofager (Tizard, 2013). SP-D kan även brytas ned av extracellulära proteaser (Sorensen et al., 2007).

In vivo-studier på råttor har också visat att syrehalt och cytokiner som IL-4, IL-12, IL-13 och TNF- $\alpha$  påverkar mängden SP-D. Exakt vilka och hur olika cytokiner inverkar på SP-D-nivåerna är dock oklart (Sorensen et al., 2007; Gaunsbaek et al., 2013).

### **Lunghomeostas och antiinflammatoriska funktioner**

SP-D har en viktig roll för normala lunghomeostasen. Brist på SP-D kan leda till en komplex kronisk inflammation i lungan med makrofagaktivering och ackumulering av multinukleära skummiga alveolarmakrofager, alveolär destruktion samt ansamling av lipider, SP-A och SP-B (Bianca et al., 2001; Fujita et al., 2005). Möss utan SP-D har makrofager som producerar mer oxidativa molekyler som väteperoxid, och deras makrofager undergår också nekros och apoptos fortare. Mössens lungor uppvisar även emfysematösa förändringar som förstörade luftrum, ökad peribronkiell och perivaskulär ansamling av lymfocyter, uppreglering av IL-6 och IL-12 (Sin et al., 2008; Grubor et al., 2004). Det är ej helt klarlagt hur SP-D bidrar till lunghomeostasen och utövar sin antiinflammatoriska effekt men generellt kuvar SP-D inflammatoriska responser i en normal frisk lunga men ökar inflammationen i en skadad eller infekterad lunga (Fujita et al., 2005). Detta tros bero på att fria icke-bundna SP-D-molekyler har en

antiinflammatorisk funktion medan bundna SP-D-molekyler har en proinflammatorisk funktion (Sorensen et al., 2007). Det sker även ett samarbete mellan SP-D och andra utsöndrade molekyler i lungan för att hämma inflammation, bl.a uppbinding av IgE-antigen för att förhindra IgE-inbinding, reglering av eosinofilmigration genom att inhibera kemotaxinerna eosinofilic cationic protein och eotaxin, antioxidantegenskaper, inhibering av histaminfrisättning, hämmad lymfocytproliferation samt modifiering av olika immuncellers svar på olika stimuli (Sin et al., 2008; Sorensen et al., 2007; Wang et al., 2000). SP-D är också viktigt för att avlägsna apoptotiska och nekrotiska celler och kan på så sätt förhindra att inflammation induceras samt upplösa pågående inflammationer (Sorensen et al., 2007; Sin et al., 2008).

### **Funktion i immunförsvaret**

SP-D är en kollektin som ingår i en grupp av s.k pathogen recognition molecules (PRMs), d.v.s känner igen ett brett spektrum välkonserverade molekyllära strukturer på ytan på främmande partiklar. Det förekommer i mycket högre koncentrationer än andra kollektiner och anses därför utgöra det största försvaret i oskadade perifera delar av lungor (Crouch, 1998). SP-D kan interagera med vissa gramnegativa bakterier genom att binda sockermolekyler i kärnoligasackariden på lipopolysackarider som uttrycks. Interaktionen är dock beroende av LPS-molekylens uppbyggnad vilket gör att effekten av SP-D varierar mellan olika bakterier. Andra mikroorganismer som SP-D har affinitet för är Mykobakterier, vissa grampositiva bakterier som *Staphylococcus aureus*, vissa fungi som *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* och *Pneumocystis carinii* samt influensa A-virus (Sin et al., 2008).

Interaktionen med främmande molekyler och patogener underlättar för immunförsvaret genom bl.a agglutinerig, opsonisering och förstärkt fagocytos, främjad neutralisering samt direkt lysis av vissa mikroorganismer. SP-D höjer också produktion av superoxidjoner och cytokiner hos makrofager, ökar antigenpresentation genom att stimulera omogna dendritiska celler samt har kemotaktiska egenskaper (Soerensen et al., 2004; Soerensen et al., 2005; Grubor et al, 2004).

Många studier har visat att SP-D i vissa fall också kan användas för behandling. Nyfödda lamm intratrachealt behandlade med rekombinant humant SP-D kunde skyddas från systemiska effekter av intrapulmonärt inokulerade LPS från *E.coli*. Behandlingen förhindrade läckage av LPS från lungorna till cirkulationen och sepsis uteblev. Det visades också ge ett minskat uttryck av proinflammatoriska cytokiner som IL-1 $\beta$  och IL-6 i lungan samt IL-1 $\beta$ , IL-8 och IL-6 i lever och mjälte (Ikegami et al., 2006).

### **Förändringar vid lungskada**

Vid lungskador reagerar SP-D på liknande sätt som akutfasproteiner. Bakteriell lunginflammation på häst leder till att SP-D-nivåerna i serum följer samma mönster som akutfasproteinet serumamyloid A (SAA) men ligger något före tidsmässigt eftersom reaktionen initialt sker lokalt i lungan. Samma har visats vad gäller SP-D-förändringarna i BAL-vätska på möss med LPS-inducerad inflammation där mönstret är samma som för akutfasproteinet mannosbindande protein (Hobo et al., 2007; Fujita et al., 2005).

Uttrycket och förekomsten av SP-D i lungorna är starkt beroende av den rådande miljön i lungan. Olika sjukdomar och tillstånd påverkar lungan i varierande grad vilket också innebär att variationerna i SP-D följer olika mönster beroende på hur lungan påverkas (Sorensen et al., 2007). En väldigt viktig faktor är etiologin bakom lungproblemet. Grubor et al., (2004) visade att tre månader gamla lamm inokulerade med gramnegativa bakterien *Mannheimia haemolytica* fick ett nedreglerat uttryck av SP-D-mRNA i lungan. Meyerholz et al., (2004) visade å andra sidan att neonatala lamm inokulerade med Parainfluenzavirus III hade ökade nivåer av SP-D-mRNA. Olika patogener påverkar således SP-D olika där gramnegativa bakterier och hög inflammationsintensitet verkar minska uttrycket medan virus tycks öka uttrycket.

Förändrad cellsammansättning är en viktig faktor som påverkar SP-D-nivåerna vid perifer lungskada. En förändring av cellsammansättningen kommer i sin tur att påverka SP-D-homeostasen genom förändrad nedbrytning, syntes, sekretion, läckage och återvinning etc. En av många förändringar i cellsammansättning som sker vid akut inflammation är en kraftig infiltration av neutrofiler. Vid inflammation ökar neutrofilernas nedbrytningsförmåga av SP-D, vilket alltså skiljer sig från icke-inflammatoriska tillstånd där neutrofilernas nedbrytningsförmåga är försumbar. Förutom detta minskar samtidigt makrofagernas och typ 2 pneumocyternas nedbrytningsförmåga. Neutrofilernas nedbrytningsförmåga vid inflammation har också visats variera beroende på om de lokaliseras i BAL-vätska eller lungparenkym, där förmågan är högre i BAL-vätska (Herbein and Wright, 2001).

### **Roll som biomarkör**

Majoriteten av de studier som gjorts är humana, men betydelsen av SP-D som biomarkör är fortfarande inte helt klarlagd på humansidan och således inte heller på veterinärsidan. SP-D kan mätas både i serum och i BAL-vätska och förhållande mellan dessa kan jämföras i en s.k. BAL:serum-ratio. Förändringarna i serum och BAL-vätska behöver nödvändigtvis inte korrelera eller påverkas av samma faktorer, vilket innebär att ett visst tillstånd i lungan kan påverka SP-D-nivåerna i BAL-vätska medan ett annat tillstånd kan påverka SP-D-nivåerna i serum. Hur bra biomarkör SP-D är för olika lungsjukdomar kan således bero på om nivåerna mäts i serum eller BAL-vätska eftersom de inte behöver följa samma mönster. Exakta mekanismerna bakom förändringarna är inte klarlagda och inte heller hur de förhåller sig till varandra (Gaunsbaek et al., 2013).

Många lungsjukdomar har olika patogener och patofysiologi samt klassificeras olika beroende på allvarlighetsgrad, duration, utbredning och morfologi, men hur mycket repektive klassificeringsgrund påverkar och vilken betydelse deras inbördes förhållande har på SP-D-nivåer är oklart. Det är däremot fastställt att de spelar en viktig roll för hur bra SP-D fungerar som biomarkör. Detta har setts på humansidan där SP-D verkar kunna utgöra biomarkör för vissa typer av lungsjukdomar men inte andra. I en humanstudie av Honda et al (1995) testades nivåerna av SP-D i serum och BAL-vätska på människor med en rad olika lungdiagnoser, bl.a idiopatisk lungfibros (IPF), interstitiell pneumoni med kollagensjukdom (IPCD), pulmonär alveolär proteinos (PAP), pulmonär tuberkulos och

pulmonär sarcoidos m.f. Studien visade att serumnivåerna av SP-D hos patienter med IPF, IPCD och PAP var signifikant förhöjda medan andra lungsjukdomar inte uppvisade några signifikanta skillnader alls. Även BAL-nivåerna var förhöjda för PAP, men inte för IPF och IPCD. SP-D har också visats kunna användas vid kronisk obstruktiv lungsjukdom (COPD) på människa, dels genom att serumnivåerna var förhöjda när sjukdomen var stabil ("stable COPD") och korrelerade med allvarlighetsgraden, och dels genom att serumnivåerna ökade ytterligare vid förvärringar av sjukdomen ("acute exacerbations COPD") (Ju, Liu och Chen, 2012). Hur mycket durationen/kroniciteten påverkar nivåerna av SP-D verkar variera. Gaunsbaek et al (2013) visade att dock i sin studie SP-D-nivåerna i serum på möss ökade oavsett om inflammationen var akut, subakut eller kronisk, med absolut störst ökning vid subakut och kronisk inflammation. För BAL-vätska sågs liknande förändringar men med störst ökning vid akut och subakut inflammation.

Det är okänt exakt hur och varför SP-D-nivåerna i serum förändras, men till viss del beror serumnivåerna på genetiska skillnader då SP-D-nivåer i serum verkar vara relaterad till polymorfism i SP-D-genen. På människa är drygt 80% av variationen i serumnivåer genetiskt betingad p.g.a att generna ligger till grund för multimeriseringen och storleken på SP-D och således kapaciteten att tränga igenom alveolbarriären. Många studier tyder också på att serumnivåerna av SP-D ökar från ung till vuxen ålder medan nivåerna i bronkoalveolärt lavage istället minskar, vilket beror på att epitelbarriären gradvis försämras med åldern och SP-D läcker ut till blodet (Sorensen et al., 2007).

Variationer i uttryck av SP-D-mRNA kan även påverka resistens mot olika infektionsagens och på så sätt bidra till individuella variationer i serumnivåer vid olika lungsjukdomar (Grubor et al., 2004). Även faktorer som bl.a koncentrationsgradienter, storlek på SP-D och laddning har stor betydelse. En uppreglering av SP-D hos typ 2 pneumocyter skapar en större koncentrationsgradient mellan lunga och blod vilket främjar övergången av SP-D från lunga till serum. De senaste studierna visar att det också kan bero på post-translationell modifiering av SP-D som genererar små subenheter av proteinet vilket gör att de lättare tar sig igenom alveolbarriären (Gaunsbaek et al., 2013). Vattenlösligheten spelar också stor roll, och SP-D som är en mer hydrofil molekyl än t.ex SP-A gör att SP-D når cirkulationen lättare (Eisner et al., 2003). Hur clearance från blodet påverkar är inte heller väl studerat men verkar vara oberoende av filtrationen i njurens glomeruli, och likheter med mannosbindande protein tyder också på att clearance från blodet troligen är långsam (Pan et al., 2001; Sorensen et al., 2007). Ytterligare förklaringar till varierande SP-D-serumnivåer är:

- Destruerad barriär mellan alveolärt epitel och endotel p.g.a skadat basalmembran
- Förhöjda nivåer av SP-D i perifer lungvätska och i lungparenkym genom ökad produktion och/eller sekretion från claraceller och/eller typ 2 pneumocyter orsakat av hyperplasi, hypertrofi eller uppreglering av mRNA etc
- Ökad diffusion och/eller translokation
- Förlust av apikal-basolateral cellpolaritet vid proliferation och därmed eventuellt basolateral sekretion av SP-D direkt till cirkulationen
- Förändrad distributionsvolym

- Extrapulmonär produktion

(Tzouvelekis et al., 2005; Wang et al., 2000; Fujita et al., 2005; Pan et al., 2001; Gaunsbaek et al., 2013).

Majoriteten av alla studier som gjorts visar dock att ökade serumnivåer av SP-D vid lungskador f.f.a beror på ökat läckage från lungorna till cirkulationen till följd av en skadad epitelbarriär. Taylor et al. (2000) konstaterar att amiodaron, som ger upphov till akut toxicitet med efterföljande fibros i lungan, rubbar alveolbarriären hos råttor. Mätningar visade att albuminnivåer i bronkoalveolär vätska kraftigt ökade några dagar efter att amiodaron administrerats, vilket innebär att albumin läckt in från blodcirkulationen till lungorna p.g.a skadad epitelbarriär. Samtidigt mättes SP-D-nivåerna i serum som också ökade under den tiden initial skada och inflammation inträffade, vilket innebär att SP-D istället läckte ut från lungorna till blodcirkulationen. Förutom att reflektera epitelbarriärens status tros SP-D också kunna reflektera allvarlighetsgraden på en lungsjukdom eftersom allvarlighetsgraden många gånger är kopplad till just epitelbarriärens status. Hobo et al (2007) visade att SP-D-nivåerna i serum hos hästar inokulerade med grampositiva bakterien *Streptococcus zooepidemicus* ändrades parallellt med hästarnas kliniska tillstånd genom att öka när symtomen förvärrades och minska när symtomen blev mildare. Eftersom förändringarna i SP-D-serumnivåer inträffade ungefär samtidigt som förändringar i det kliniska tillståndet dras slutsatsen att SP-D-nivåerna i serum reflekterar både allvarlighetsgrad och epitelbarriärens tillstånd. Det finns också humana studier som visar att serumnivåerna av SP-D vid vissa lungsjukdomar, bl.a PAP, korrelerar med allvarlighetsgraden (Honda et al., 1995).

Liksom för serumnivåer är det okänt exakt hur och varför SP-D-nivåerna förändras i BAL-vätska. Vid LPS-inducerad akut inflammation på möss ökar SP-D-nivåer i BAL-vätska redan några timmar efter inokuleringen och fortsätter att stiga under några dygn (Gaunsbaek et al., 2013). Liknande ses på råttor där SP-D-nivåerna dock först signifikant minskar efter 6h men stiger därefter och blir signifikant höjda efter 72h (McIntosh et al., 1996). Likaså höjs nivåerna i BAL-vätska vid kronisk inflammation, både på transgena möss där inflammationen induceras genom överuttryck av TNF- $\alpha$  och på möss experimentellt infekterade med svampen *Pneumocystis carinii* (Fujita et al., 2005; Gaunsbaek et al., 2013). Vid ren hyperplasi av typ 2 pneumocyter, d.v.s utan inflammation, uppvisas också förhöjda nivåer av SP-D i BAL-vätska samt i serum (Pan et al., 2001).

SP-D-nivåerna i BAL-vätska påverkas också av astma där vissa humana studier har visat signifikant sänkta nivåer medan andra studier visar på förhöjda nivåer. Vid IgE-inducerad inflammation (astmaattack) i lungorna på möss minskade SP-D-nivåerna i BAL-vätska precis när astmaattacken nådde sin topp, d.v.s synkront med den inflammatoriska process som sker i lungorna under en astmaattack. När astmaattacken sedan lugnade ner sig återgick SP-D gradvis tillbaka till tidigare nivåer igen (Wang et al., 2000; Sorensen et al., 2007). Vad gäller serumnivåerna av SP-D vid astma är de enligt humanstudier förhöjda (Sorensen et al., 2007). Stress är också en viktig faktor till förändrade SP-D-nivåer i BAL-vätska. Hobo et al. (2001) har visat att stress som uppstår vid transport påverkar nivåerna



av SP-D i BAL-vätska hos hästar. Efter en 41h lång transport hade SP-D-nivåerna minskat med 36%. Vad som orsakar förändringarna i SP-D i BAL-vätska tros f.f.a vara ett cytokinberoende uppreglerat uttryck av SP-D-mRNA, med hyperplasi av typ 2 pneumocyter och/eller claraceller samt förändrad nedbrytning och clearance är andra tänkbara orsaker (Casey et al., 2005; McIntosh et al., 1996). Många gånger kan det således vara samma faktorer som påverkar SP-D-nivåerna i både BAL-vätska och serum, ibland så att de korrelerar positivt, ibland så att de korrelerar negativt och ibland utan korrelation. Negativ korrelation kan bl.a ses när alveolbarriären är kraftigt skadad varvid serumnivåerna av SP-D höjs, medan nivåerna i BAL-vätska inte påverkas alls p.g.a kontinuerligt läckage (Fujita et al., 2005).

Inom veterinärmedicinen är endast ett fåtal studier gjorda på rollen av SP-D som biomarkör för perifera lungproblem, och häst är det djurslag som studerats mest. Richard et al., (2011) utförde en studie på 42 varmblodiga travhästar för att undersöka koncentrationen av SP-D i blod vid perifer inflammatorisk lungsjukdom (IAD). Exklusionskriterier för sjukdomen var antingen ansträngd andning under vila eller systemiska tecken på infektion. Hästarna fick genomgå en grundlig klinisk undersökning innan de utsattes för ett löpbandstest i tre steg med olika lutning och hastighet. BAL utfördes 60 minuter efter träning för att göra ett cytologiskt prov på BAL-vätskan varpå diagnos kunde ställas. 22 hästar fick diagnosen IAD och resterande 20 blev kontrollgrupp. Hästar med IAD hade signifikant högre antal neutrofiler och lägre antal makrofager än kontrollgruppen men cytologiska profilen varierade i övrigt. Venösa blodprov togs från jugularvenen vid vila på morgonen och 60 minuter efter träning för att mäta SP-D-nivåerna i serum. Detta gjordes m.h.a ett, för människor avsett, kommersiellt ELISA-kit med monoklonala antikroppar som känner igen CRD-regionen på SP-D. Hästar med IAD hade signifikant högre serumkoncentration av SP-D vid vila och 60 minuter efter träning. Författarna räknade ut ett gränsvärde på 48ng/ml, där hästar med SP-D nivåer högre än detta ansågs lida av IAD medan hästar med SP-nivåer lägre än det ansågs vara friska. Inom de båda grupperna sågs ingen skillnad i serumkoncentration av SP-D varken före eller efter träning, och således verkar inte ansträngning påverka SP-D-nivåer i lungan. Ingen signifikant korrelation mellan SP-D-nivåerna i serum och cytologiska profilen i BAL-vätskan kunde ses heller. Detta tros dock bero på att IAD är en så dåligt definierad sjukdom där väldigt varierande cytologiska profiler kan tillåtas och ändå definieras som IAD. Eftersom olika cytologiska profiler också ger olika cytokinprofiler, vilket i sin tur kan ge olika patofysiologiska processer inblandade i IAD, kan detta påverka BAL- och serumnivåer av SP-D men vilken betydelse det har är oklart (Richard et al., 2011).

## DISKUSSION

Biomarkörer är utöver symtom och klinisk undersökning ett av de viktigaste verktygen för att ställa diagnos och fatta terapeutiska beslut. Svårigheten med biomarkörer är dock dels att definiera specifika tröskelvärden och dels att hitta biomarkörer som är specifika. SP-D har varit en lovande kandidat på humansidan, både tack vare dess lungspecifitet och det faktum att nivåerna förändras i reaktion på skada. Trots att väldigt många studier gjorts på människa verkar det ändå inte finnas några konkreta svar på hur SP-D faktiskt beter sig vid lungsjukdom eller ens i en normal lunga. Det finns flera faktorer som försvårar användandet av SP-D som biomarkörer för perifera lungproblem på humansidan, och än värre är det inom veterinärmedicinen:

- Skillnader i SP-D-molekylens uppbyggnad, struktur och funktion
- Skillnader i reglering och normalvärden
- Skillnader mellan olika skadeagens och patofysiologi
- Skillnader mellan olika mät- och analysmetoder

Det råder inga tvivel om att det finns stora oklarheter om SP-D, f.f.a dess betydelse vid lungskador. Till idag är det dock konstaterat att det är ett protein som är inblandat i immunförsvaret i varierande grad och med varierande funktion och många studier visar även att det är viktigt för den normala homeostasen i lungan (Fujita et al., 2005; Bianca et al., 2001). Exakta regleringsmekanismerna är dock fortfarande inte helt klarlagda. Detta kanske inte är så konstigt med tanke på den komplexitet som råder på cell- och molekylnivå eftersom det är otroligt många faktorer som spelar in. Den kanske mest grundläggande faktorn som bidrar till komplexitet finns på DNA-nivå, d.v.s genetiska skillnader som i stort sett är förutbestämda vid födseln. Om generna som kodar för SP-D och de efterföljande modifieringarna är olika kommer proteinets immanenta egenskaper, t.ex uppbyggnad och struktur, att variera (Crouch et al., 1998; Sorensen et al., 2007). De genetiska skillnaderna blir också större ju längre bak i evolutionsträdet jämförelser görs. Det innebär alltså att skillnaderna mellan individer inte är lika stor som skillnaden mellan olika arter, vilket gör att tillämpningen av SP-D som biomarkör inom veterinärmedicin troligen försvåras och kanske inte heller direkt kan extrapoleras från humanmedicinen. Några av de genetiska variationer som setts är t.ex att grisens SP-D är större än människans eller det faktum att nötkreatur kan utsöndra små enkla trimerer (Soerensen et al., 2004). Eftersom olika uppbyggda molekyler interagerar olika kan eventuella variationer på DNA-nivå kan leda till olika reaktioner på samma fysiologiska och patofysiologiska processer. I många fall verkar dock inte generna, åtminstone inte inom ett och samma djurslag, spela den största rollen, vilket kan ses genom att ett och samma agens kan drabba genetiskt olika människor men ändå ge samma kliniska bild för alla. Mer invecklat är det på veterinärsidan där olika djurarter däremot inte alls behöver visa samma kliniska bild av samma agens (López, 2012).

Det är dock inte bara SP-D-molekylen i sig som påverkar, även andra molekyler och fysiologiska processer involverade i reglering eller på annat sätt inverkar på SP-D kan vara minst lika viktiga. Detta kan vara processer som nedbrytning, syntes, sekretion,

återvinning och läckage m.m. (Herbein och Wright, 2001). Eftersom även detta i grund och botten är styrt av gener föreligger också skillnader där, vilket påverkar vad som är normalt för olika individer och djurslag. Exempelvis behöver individer med låga normalvärden av SP-D inte få högre värden vid sjukdom än en frisk individ som har höga normalvärden. Istället skulle individer med höga normalvärden kunna ha ett starkare immunförsvar än individer med låga normalvärden. Förutom ovanstående påverkar också var i kroppen SP-D uttrycks. Studier har visat att SP-D kan produceras extrapulmonärt, och nödvändigtvis inte på samma ställen hos alla djur (Meyerholz och Ackermann, 2005; Soerensen et al., 2005). Hos häst finns SP-D t.ex i synovialvätska där det är viktigt för fosfolipidhomeostasen och utgör ett viktigt smörjmedel i leder (Kankavi och Roberts 2004). Detta gör att SP-D-nivåerna kan förändras vid leddskador och försämra pålitligheten av SP-D som biomarkör specifik för lungskador. Sett till detta går det snabbt inse att enkla självklara slutsatser kring SP-Ds fysiologi och roll som biomarkörer för olika djurslag och mellan individer är svåra att dra.

Lika viktiga som olika individers och arters immanenta skillnader mellan SP-D är, är också yttre faktorer. Yttre påverkan på lungan i form av skadeagens kommer att leda till någon form av respons och rubba den normala homeostasen för SP-D. Denna respons varierar dels beroende på vad det är för yttre faktor och dels på individens immanenta egenskaper, d.v.s strukturen och uppbyggnaden av SP-D samt dess reglering. Responsen är en patofysiologisk process som har visats vara avgörande för hur bra SP-D kan användas som biomarkör. Många gånger är dock de patofysiologiska processerna inte helt kända, och dessutom kan de oftast inte generaliseras och antas gälla för alla arter, om ens för alla individer inom samma art (López, 2012). Ett bra exempel är IAD på häst. Sjukdomen saknar en klar definition och tillåter väldigt varierande cytologiska profiler, vilket på många sätt skulle kunna inverka på den patofysiologiska processen (Richard et al., 2011). Det hela försvåras också av att det fortfarande finns oklarheter kring hur normala fysiologin ser ut för SP-D, vilket således inte underlättar för att förstå hur patofysiologiska processer påverkar SP-D.

De yttre faktorerna behöver dock inte alltid innebära skadeagens. Den naturliga miljön en individ lever kommer troligtvis ha en stor inverkan på lungan och dess SP-D. Hästar som står installade vistas i en sämre miljö för lungorna och löper bl.a större risk att drabbas av IAD och som tidigare nämnts har hästar med IAD högre serumnivåer av SP-D än friska hästar (Sjaastad et al., 2010; Richard et al., 2011). Detta innebär att hästar på jordens norra hemisfär där hästarna ofta står installade, kan p.g.a miljön ha högre nivåer av SP-D än hästar i andra delar av världen. Ökningen av SP-D i lungorna hos installade hästar kan dels vara en anpassning till den sämre miljön, d.v.s ett försök att förstärka immunförsvaret genom en ökning av SP-D, och dels en konsekvens av en eventuell IAD om problemet fortskridit så långt att IAD faktiskt hunnit utvecklas. Inledningsvis skulle alltså en hög SP-D-nivå kunna innebära ett anpassat immunförsvar och installade hästar skulle därmed kunna vara mer kapabla att hantera sämre miljöer än hästar som vistas ute. Således behöver höga SP-D-nivåer i tidigt stadium inte betyda något negativt, dessutom skulle det kunna fungera som en miljöindikator. Sett till detta är miljön därmed en faktor som kan komplicera användningen av SP-D som biomarkör relativt mycket, f.f.a genom att vidga

ramarna för vilka SP-D-nivåer som är normalt och inte. Gränsvärdet på 48ng/ml som sattes i studien av Richard et al (2011) behöver alltså inte gälla för alla hästar.

Yttre faktorer i form mediciner kan också påverka SP-D-nivåerna. Som tidigare nämnt har det visats att humant DNA uppströms om SP-D-genen innehåller glucocorticoid responsive elements som svarar på glukokortikoider. Om dessa också finns på djur säger litteraturen inget om, men Hobo et al (2001) visar i sin studie att transport leder till minskade nivåer av SP-D i BAL-vätska. Eftersom glukokortikoider är starkt kopplade till stress (Sjaastad et al., 2010), vilket i sin tur är kopplat till transport tyder studien av Hobo et al (2001) på att glukokortikoider med stor sannolikhet påverkar uttrycket av SP-D även hos häst. Om så är fallet skulle det kunna innebära att djur under behandling med glukokortikoider för en eventuell annan åkomma får missvisande resultat när SP-D ska undersökas för lungproblem.

Variation orsakade av olika mät- och analysmetoder kan markant påverka resultaten från en studie, och en stor studiepopulation inte behöver därmed betyda någonting om analysmetoden är fel. Mät- och analysvariationer oerhört viktiga att ta hänsyn till vid alla mätningar och analyser som skall komma att göras om SP-D börjar användas kliniskt. I studien utförd av Richard et al (2001) användes ett ELISA-kit avsett för människor, vilket eventuellt kan tänkas förvränga resultaten från verkligheten. Antikropparna band i detta fall till CRD-domänet som har visats vara nästintill identiskt mellan häst och människa och variationen borde därmed inte vara så stor. På tillverkarnas hemsida går det dock läsa att ELISA-testet uppvisar korsreaktivitet med ekvint SP-D, vilket nödvändigtvis inte betyder att det fungerar lika bra som på humant SP-D. Att kunna använda humana analysmetoder på djur är något som underlättar för den veterinära forskningen och den eventuellt kommande kliniska användningen av SP-D som biomarkör. ELISA-kitet som användes i studien av Richard et al (2011) är avsett för multipla prover och inte enstaka prov, vilket innebär att analysmetoden är olämplig i praktiken då man oftast endast provtar enstaka hästar.

Ovanstående beskrivna faktorer påverkar användbarheten av SP-D som biomarkör för perifera lungproblem. Hur mycket de olika faktorerna påverkar var för sig är det svårt att dra några säkra slutsatser om. Det är dock inte absolut säkert att dessa skillnader behöver påverka rollen som biomarkör i någon signifikant grad alls i vissa fall. Som tidigare nämnts kan SP-D t.ex binda till vissa gramnegativa bakteriers LPS-molekyler, men bindningskapaciteten varierar beroende på hur LPS-molekylen är uppbyggd och troligen också på hur SP-D-molekylen är uppbyggt (Sin et al., 2008). Bindningskapaciteten kommer därefter troligen också reflektera lungans svar och på detta sätt påverka den patofysiologiska processen. Det förekommer alltså ett starkt förhållande mellan yttre faktorer och immanenta egenskaper som är väldigt komplext och i stort sett omöjliggör enkla svar. Skillnaderna mellan yttre faktorer och immanenta egenskaper är också större på veterinärsidan än på humansidan sett till att veterinärmedicinen till skillnad från humanmedicinen måste hantera mellanartsskillnader. Eftersom också så få studier är gjorda på veterinärsidan blir det ännu svårare att dra några konkreta slutsatser, och fortfarande verkar det inte finnas några studier som konfirmerar användbarheten av SP-D

som biomarkör för perifera lungproblem på djur. Trots alla svårigheter har SP-D dock visats vara användbar som biomarkör för vissa typer av perifera lungproblem på människor, även om forskningen fortfarande inte har kunnat förklara exakt varför den fungerar på vissa sjukdomar och andra inte, men en uppsjö teorier finns. Frågan är hur viktigt det faktiskt är att förstå de exakta mekanismerna när det väl konstaterats att SP-D fungerar som biomarkör för en viss sjukdom. Mer kunskap om mekanismer kommer öka möjligheten till extrapolering mellan olika sjukdom samt mellan olika individer och arter, men litteraturen talar för att ju djupare något undersökts, desto mer komplext blir det. På vilket sätt forskningen väljer att angripa problemet återstår att se, men oavsett behövs fler studier.

## REFERENSER:

- Bianca A. W. M. van Rozendaal, Lambert M. G. van Golde, PhD, and Henk P. Haagsman, PhD (2001). Localization and functions of SP-A and SP-D at mucosal surfaces. *Pediatric Pathology and Molecular Medicine*, vol 20, ss. 319-339  
Tillgänglig: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1080/15513810109168824> [2014-02-04]
- Casey J., Kaplan J., Atochina-Vasserman E. N., Gow A. J., Kadire H., Tomer Y., Fisher J. H., Hawgood S., Savani R. C, Beers M. F. (2005). Alveolar Surfactant Protein D Content Modulates Bleomycin-induced Lung Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 172, ss 869-877.  
Tillgänglig : [http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200505-767OC?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200505-767OC?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed) [2014-02-11]
- Crouch E. C. (1998). Structure, biologic properties, and expression of surfactant protein D (SP-D). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1408, ss. 278-289  
Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443998000738> [2014-02-06]
- Eisner M. D., Parsons P., Matthay M. A., Ware L., Greene K. (2003). Plasma surfactant protein levels and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Thorax*, vol. 58, ss. 983–988  
Tillgänglig: <http://thorax.bmj.com/content/58/11/983.full> [2014-02-10]
- Fujita M., Shannon J. M., Ouchi H., Voelker D. R., Nakanishi Y., Mason R. J. (2005). Serum surfactant protein D is increased in acute and chronic inflammation in mice. *Cytokine*, vol. 31, ss. 25-33  
Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466605001109> [2014-02-18]
- Gaunsbaek M. Q., Rasmussen K. J., Beers M. F., Atochina-Vasserman E. N., Hansen S. (2013). Lung Surfactant Protein D (SP-D) Response and Regulation During Acute and Chronic Lung Injury. *Lung*, vol. 191, ss. 295-303  
Tillgänglig: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00408-013-9452-x> [2014-02-19]
- Grubor B., Gallup J. M., Ramírez-Romero R., Bailey T. B., Crouch E. C., Brogden K. A., Ackermann M. R., (2004). Surfactant protein D expression in normal and pneumonic ovine lung. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol 101, ss. 235–242  
Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242704001369> [2004-02-19]
- Herbein J. F., Wright J. R. (2001). Enhanced clearance of surfactant protein D during LPS-induced acute inflammation in rat lung. *American Journal Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 281, ss L268–L277  
Tillgänglig: <http://ajplung.physiology.org/content/281/1/L268> [2014-02-17]
- Hobo S, Yoshihara T, Oikawa M, Jones J. H. (2001). Surfactant proteins in bronchoalveolar lavage fluid of horses: assay technique and changes following road transport. *Veterinary Record: Journal of the British Veterinary Association*, vol. 148, s74
- Hobo S., Niwa H., Anzai T. (2007). Evaluation of Serum Amyloid A and Surfactant Protein D i Sera for Identification of the Clinical Condition of Horses with Bacterial Pneumonia. *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 69, ss. 827-830  
Tillgänglig: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/69/8/69\\_8\\_827/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/69/8/69_8_827/_article) [2014-02-06]
- Honda Y., Kuroki Y., Matsuura E., Nagae H., Takahashi H., Akino T., Abe S. (1995).

- Pulmonary Surfactant Protein D in Sera and Bronchoalveolar Lavage Fluids. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 152, ss. 1860-1866  
Tillgänglig: [http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.152.6.8520747?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed#.UycynV4zEy8](http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.152.6.8520747?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed#.UycynV4zEy8) [2014-02-06]
- Ikegami M., Carter K., Bishop K., Yadav A., Masterjohn E., Brondyk W., Scheule R. K., Whitsett J. A. (2006). Intratracheal Recombinant Surfactant Protein D Prevents Endotoxin Shock in the Newborn Preterm Lamb. *Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 173, ss. 1342-1347  
Tillgänglig: [http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200509-1485OC?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200509-1485OC?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed) [2014-02-11]
- Ju C. R., Liu W., Chen R. C. (2012) Serum surfactant protein D: Biomarker of chronic obstructive pulmonary disease. *Disease Markers*, vol. 32, ss. 281–287  
Tillgänglig: <http://www.hindawi.com/journals/dm/2012/509063/abs/> [2014-02-06]
- Kankavi O., Roberts M. S. (2004). Detection of surfactant protein A (SP-A) and surfactant protein D (SP-D) in equine synovial fluid with immunoblotting. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, vol. 68, ss.146–149  
Tillgänglig: <http://europepmc.org/abstract/MED/15188960> [2014-02-19]
- Kingma P. S., Haaning K. L., Mierke S. K. (2010). Secretion Of Pulmonary Surfactant Protein D Into Plasma In The Absence Of Lung Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 181; 2010: A4971
- López A. (2012). Respiratory System, Mediastinum, and Pleurae. I: Zachary J. F., & McGavin M. D. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5. ed. St. Louis: Mosby Elsevier, ss. 458-538
- McIntosh J. C., Swyers, A. H., Fisher J. H., Wright J. R. (1996) Surfactant Proteins A and D Increase in Response to Intratracheal Lipopolysaccharide. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 15, ss 509-519.  
Tillgänglig: [http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb.15.4.8879185?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed#.UycxWV4zF1M](http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb.15.4.8879185?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed#.UycxWV4zF1M) [2014-02-06]
- Meyerholz D. K., Ackermann M. R. (2005). Antimicrobial peptides and surfactant proteins in ruminant respiratory tract disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 108, ss. 91–96  
Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242705002424> [2014-02-10]
- Meyerholz D. K., Ackermann M. R., Lehmkuhl H. D., Anderson R. D., Lazic T., Grubor B., Gallup J. M. (2004). Adenovirus-Mediated Gene Therapy Enhances Parainfluenza Virus 3 Infection in Neonatal Lambs. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, ss. 4780–4787  
Tillgänglig: <http://jcm.asm.org/content/42/10/4780.long> [2014-02-10]
- Pan T., Nielsen L. D., Allen M. J., Shannon K. M., Shannon J. M., Selman M., Mason R. J. (2002). Serum SP-D is a marker of lung injury in rats. *American Journal Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* vol. 282, ss L824–L832  
Tillgänglig: <http://ajplung.physiology.org/content/282/4/L824> [2014-02-18]
- Richard E. A., Pitel P.-H., Christmann U., Lekeux P., Fortier G., Pronost S. (2011). Serum concentration of surfactant protein D in horses with lower airway inflammation. *Equine Veterinary Journal*, vol. 44, ss. 277–281  
Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042->

- 3306.2011.00421.x/abstract [2014-02-19]
- Sin D. D., Pahlavan P. S., and Paul Man S. F. (2008). Surfactant protein D: A lung specific biomarker in COPD? *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, vol. 2, ss. 65–74  
Tillgänglig: <http://tar.sagepub.com/content/2/2/65> [2014-02-04]
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O., Hove, K., (2010). *Physiology of domestic animals*. 2. Uppl. Oslo. Scandinavian veterinary press.
- Soerensen C. M., Holmskov U., Aalbaek B., Boye M., Heegaard P. M., Nielsen O. L. (2005). Pulmonary infections in swine induce altered porcine surfactant protein D expression and localization to dendritic cells in bronchial-associated lymphoid tissue. *Immunology*, vol. 115, ss. 526–535  
Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2567.2005.02189.x/abstract> [2014-02-04]
- Soerensen C. M., Nielsen O. L., Willis A., Heegaard P. M. H., Holmskov U. (2004). Purification, characterization and immunolocalization of porcine surfactant protein D. *Immunology*, vol. 114, ss. 72–82  
Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2567.2004.01999.x/abstract> [2014-02-04]
- Sorensen G. L., Husby S., Holmskov U. (2007). Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology* vol. 212, ss. 381–416  
Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171298507000046> [2014-02-11]
- Taylor M D., Van Dyke K., Bowman L. L., Miles P. R. (2000). A Characterization of Amiodarone-Induced Pulmonary Toxicity in F344 Rats and Identification of Surfactant Protein-D as a Potential Biomarker for the Development of the Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 167, ss. 182–190  
Tillgänglig: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X00990008> [2014-02-07]
- Tizard I. R. (2013). *Veterinary immunology*. 9. ed. St. louis: Saunders Elsevier
- Tzouvelekis A., Kouliatsis G., Anevlavis S. & Bouros D. (2005). Serum biomarkers in interstitial lung diseases. *Respiratory Research* 2005, 6:78.  
Tillgänglig: <http://respiratory-research.com/content/6/1/78> [2014-02-14]
- Wang J. Y., Shieh C. C., Yu C. K., Lei H. Y. (2001). Allergen-induced bronchial inflammation is associated with decreased levels of surfactant proteins A and D in a murine model of asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 31, ss 652-662  
Tillgänglig: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2222.2001.01031.x/abstract;jsessionid=AD8D2F4889FA0A1C63B448731244B43A.f04t02> [2014-02-11]
- Ware L. B., Koyama T., Zhao Z., Janz D. R., Wickersham N., Bernard G. R., May K. A., Calfee C. S., Matthay M. A. (2013). Biomarkers of lung epithelial injury and inflammation distinguish severe sepsis patients with acute respiratory distress syndrome. *Critical Care* 2013, 17:R253  
Tillgänglig: <http://ccforum.com/content/17/5/R253> [2014-02-08]



